

21.02.2005

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日 2004年 2月19日  
Date of Application:

出願番号 特願2004-043481  
Application Number:  
[ST. 10/C] : [JP2004-043481]

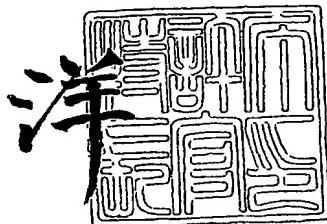
出願人 株式会社紀文フードケミファ  
Applicant(s): 熊沢 義雄

BEST AVAILABLE COPY

2005年 3月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3026196

【書類名】 特許願  
【整理番号】 A41108J  
【提出日】 平成16年 2月19日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県川崎市中原区井田 2-25-1  
【氏名】 熊沢 義雄  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都中央区入船 2-1-1 株式会社紀文フードケミファ内  
【氏名】 村田 克巳  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都北区東田端二丁目 8番15号 マンションニュー田端 31  
【氏名】 川原 一芳  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都町田市原町田 4-9-8-1602  
【氏名】 滝本 博明  
【特許出願人】  
【識別番号】 000141510  
【氏名又は名称】 株式会社紀文フードケミファ  
【特許出願人】  
【住所又は居所】 神奈川県川崎市中原区井田 2-25-1  
【氏名又は名称】 熊沢 義雄  
【代理人】  
【識別番号】 110000109  
【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
【代表者】 今村 正純  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 170347  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0209669

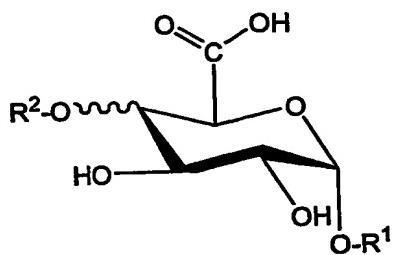
## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項1】

下記式(1)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするNK-T細胞活性化用組成物。

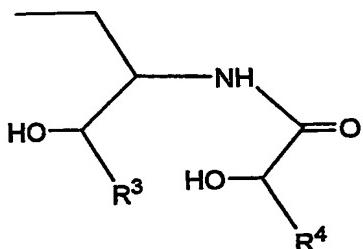
式(1)

【化1】

(式(1)中、R<sup>1</sup>は、下記式(1-1)を表す。)

式(1-1)

【化2】



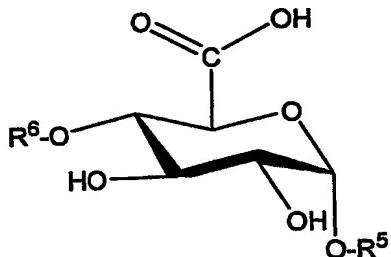
(式(1-1)中、R<sup>3</sup>は、シクロアルキル基を有していてもよいアルキル基又は、アルケニル基であり、R<sup>4</sup>は、アルキル基である。)を表し、R<sup>2</sup>は、水素原子、或いは、 $\alpha$ -ガラクトース基、 $\alpha$ -グルコース基、 $\alpha$ -マンノース基、 $\alpha$ -グルコサミン基又は $\beta$ -グルコサミン基、又はこれらの組み合わせからなる基である。)

## 【請求項2】

下記式(3)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするNK-T細胞活性化用組成物。

式(3)

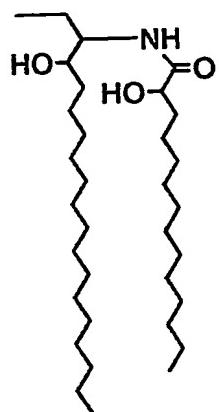
【化3】



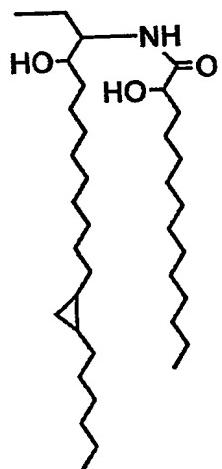
(式(3)中、R<sup>5</sup>は、下記R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>を表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、R<sup>62</sup>、R<sup>63</sup>、R<sup>64</sup>又はR<sup>65</sup>を表す。)

R<sup>51</sup>：

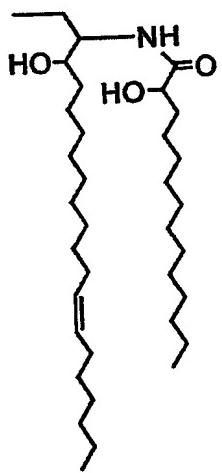
【化4】

R<sup>52</sup>:

【化5】

R<sup>53</sup>:

【化6】

R<sup>62</sup>:

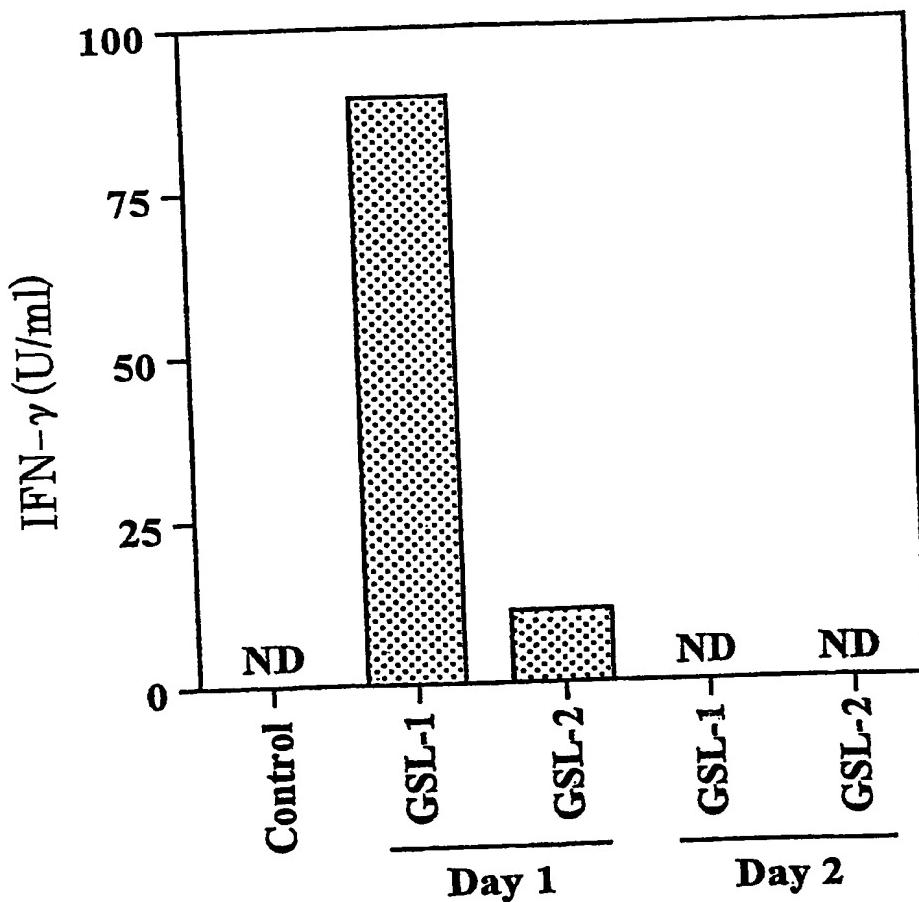
【化7】

	Day1	Day2
Control	14.5	13.7
GSL-1	18.4	22.8 *
GSL-2	21.7 *	26.1 *
GSL-6	14.6	23.4 *
GSL-7	11.9	23.2 *

単位は(%)である。

R<sup>63</sup> :

【化8】

R<sup>64</sup> :

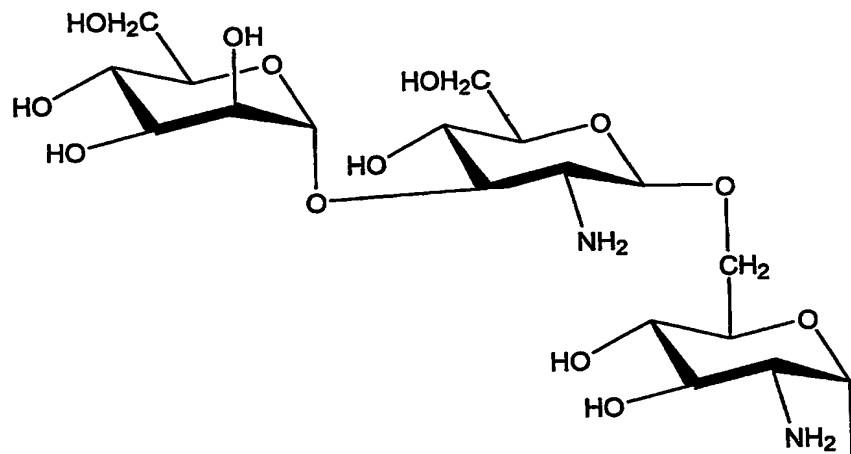
## 【化9】

	Day1	Day2
Control	3.4	3.4
GSL-1	9.8	35.5
GSL-2	24.0	25.9

単位は(%)である。

R<sup>65</sup> :

## 【化10】

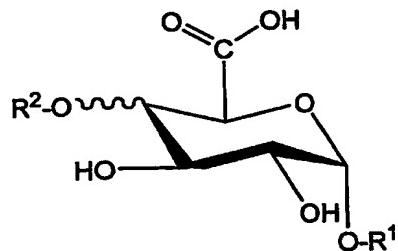


## 【請求項3】

下記式(1)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするIL-4産生促進用組成物。

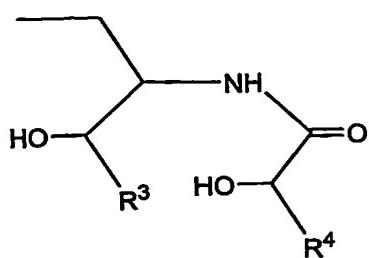
式(1)

## 【化11】



(式(1)中、R<sup>1</sup>は、下記式(1-1)  
式(1-1))

## 【化12】

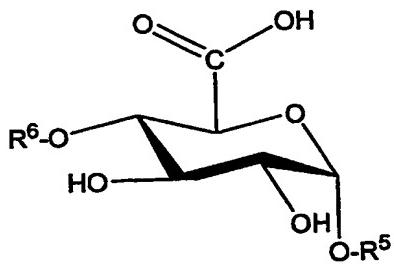


(式(1-1)中、R<sup>3</sup>は、シクロアルキル基を有していてもよいアルキル基又は、アルケニル基であり、R<sup>4</sup>は、アルキル基である。)を表し、R<sup>2</sup>は、水素原子、或いは、 $\alpha$ -ガラクトース基、 $\alpha$ -グルコース基、 $\alpha$ -マンノース基、 $\alpha$ -グルコサミン基又は $\beta$ -グルコサミン基、又はこれらの組み合わせからなる基である。)

【請求項4】  
下記式(3)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするIL-4産生促進用組成物。

式(3)

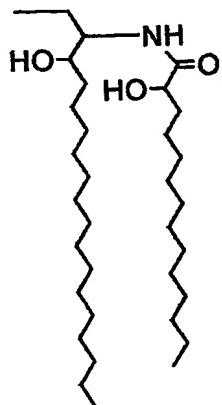
## 【化13】



(式(3)中、R<sup>5</sup>は、下記R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>を表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、R<sup>62</sup>、R<sup>63</sup>、R<sup>64</sup>又はR<sup>65</sup>を表す。)

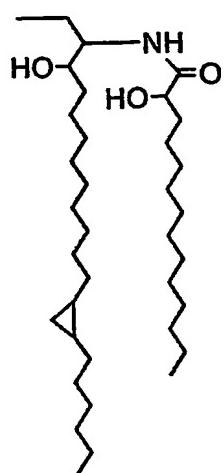
R<sup>51</sup>：

## 【化14】



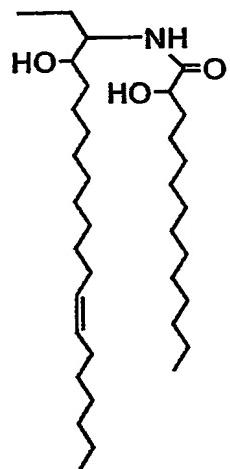
R<sup>52</sup>：

【化 15】



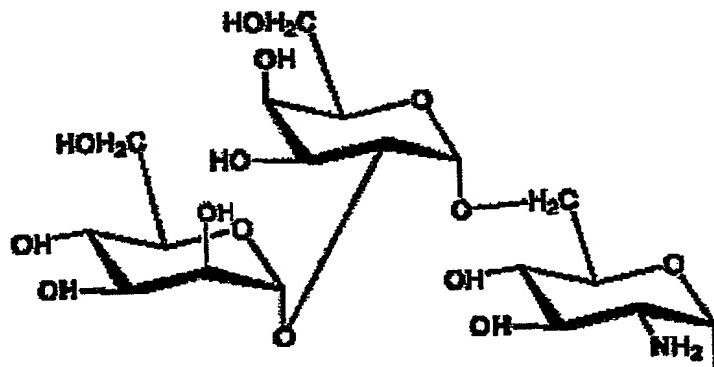
R<sup>53</sup>:

【化 1 6】



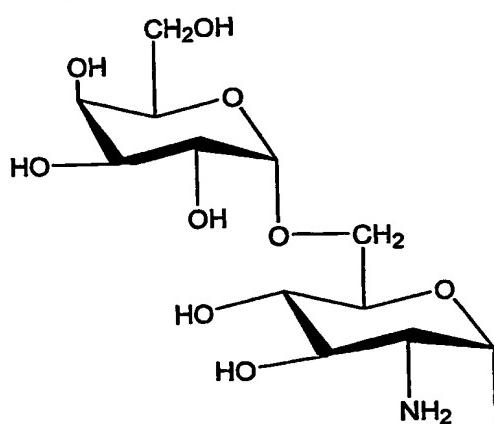
R<sup>62</sup>:

【化 17】



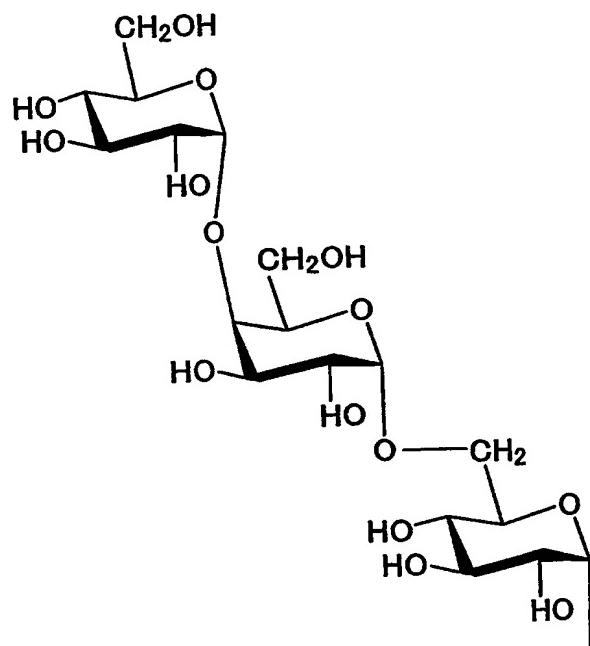
R<sup>63</sup>:

【化 18】



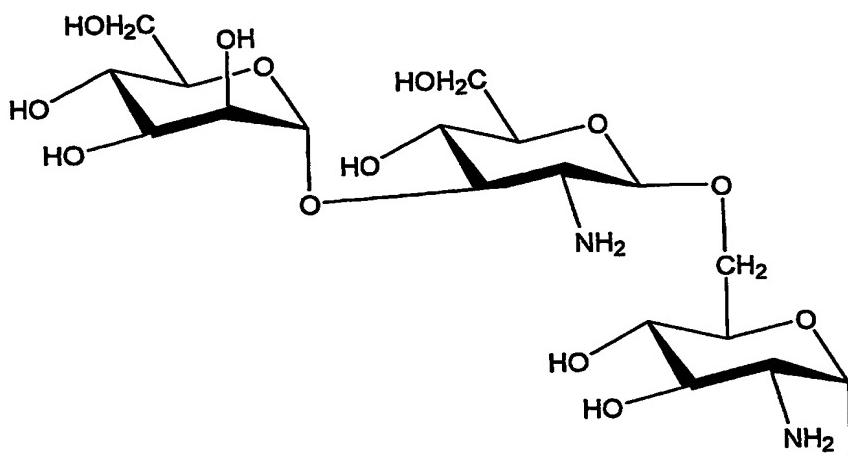
R<sup>64</sup> :

【化 19】



R<sup>65</sup>:

## 【化20】

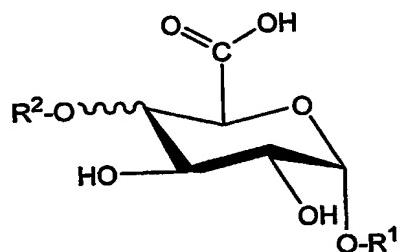


## 【請求項5】

下記式(1)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするIF  
N- $\gamma$ 産生促進用組成物。

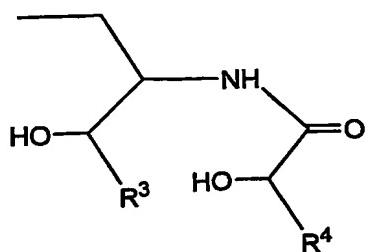
式(1)

## 【化21】

(式(1)中、R<sup>1</sup>は、下記式(1-1)

式(1-1)

## 【化22】



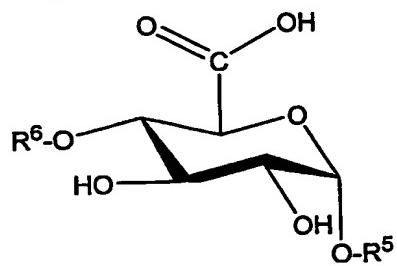
(式(1-1)中、R<sup>3</sup>は、シクロアルキル基を有していてよいアルキル基又は、アルケニル基であり、R<sup>4</sup>は、アルキル基である。)を表し、  
R<sup>2</sup>は、水素原子、或いは、 $\alpha$ -ガラクトース基、 $\alpha$ -グルコース基、 $\alpha$ -マンノース基、 $\alpha$ -グルコサミン基又は $\beta$ -グルコサミン基、又はこれらの組み合わせからなる基である。)

## 【請求項6】

下記式(3)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするIF  
N- $\gamma$ 産生促進用組成物。

式(3)

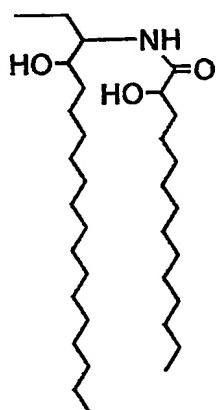
## 【化23】



(式(3)中、R<sup>5</sup>は、下記R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>を表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、R<sup>62</sup>、R<sup>63</sup>、R<sup>64</sup>又はR<sup>65</sup>を表す。)

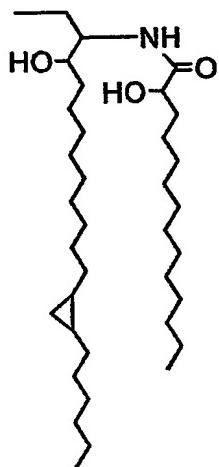
R<sup>51</sup>：

## 【化24】



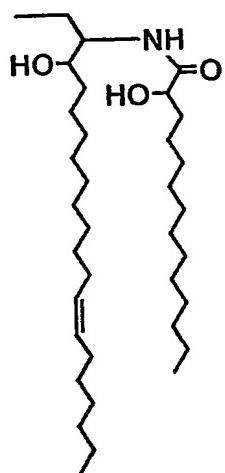
R<sup>52</sup>：

## 【化25】

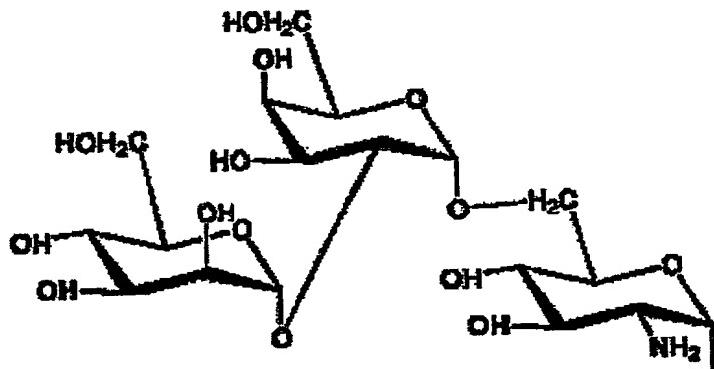


R<sup>53</sup>：

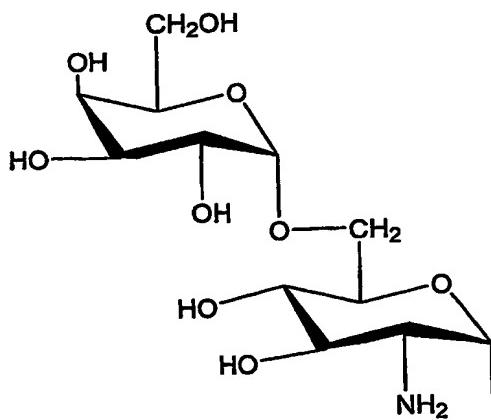
【化26】

 $R^{62}$  :

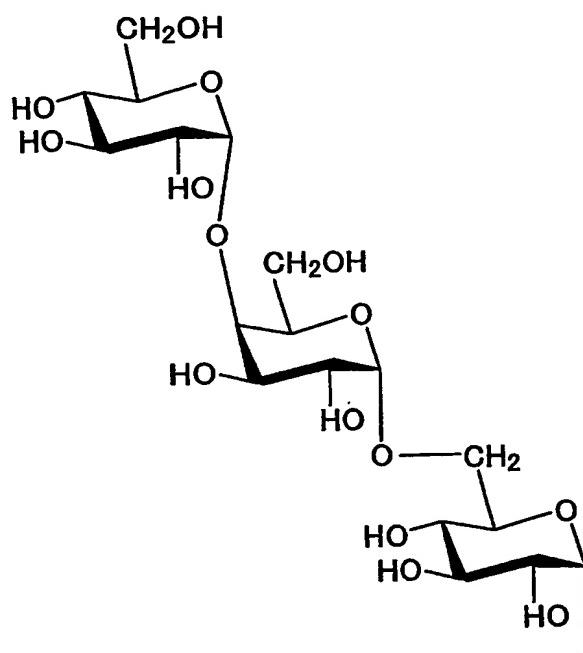
【化27】

 $R^{63}$  :

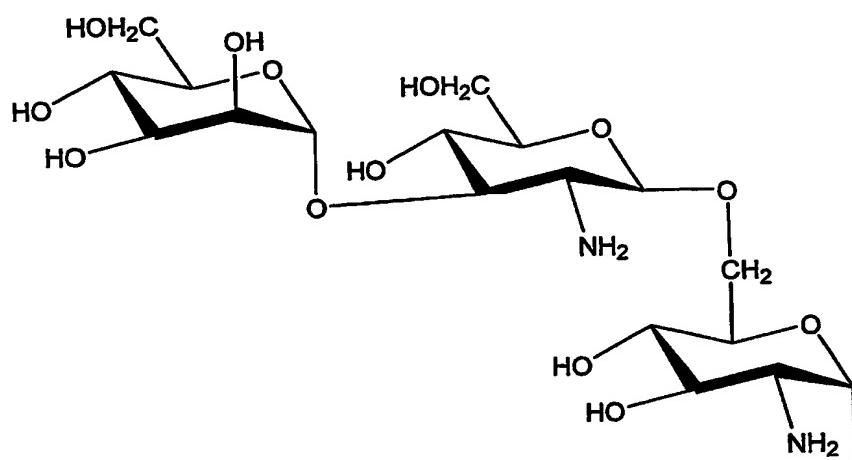
【化28】

 $R^{64}$  :

【化29】

 $\text{R}^{65}$  :

【化30】



**【書類名】明細書**

**【発明の名称】NKT細胞活性化用組成物、IL-4産生促進用組成物及びIFN-γ産生促進用組成物**

**【技術分野】**

**【0001】**

本発明は、特定の構造からなるスフィンゴ糖脂質を含むNKT細胞活性化用組成物、IL-4産生促進用組成物及びIFN-γ産生促進用組成物に関する。

**【技術背景】**

**【0002】**

従来から、スフィンゴ糖脂質は動物細胞等の表層に存在している物質であり、認識機構に関与するものと考えられている。一方、グラム陰性細菌はその細胞表層に、リポ多糖、蛋白質及びリン酸よりなる外膜を持っており、これを介して外界とのやりとりを行っている。従って、外膜の主要成分であるリポ多糖は全てのグラム陰性菌に共通に存在し、必須なものであると考えられてきた。ところが、近年になって、好気性グラム陰性菌であつて、以前シードモナス パウシモビリス (*Pseudomonas paucimobilis*) と呼ばれていたスフィンゴモナス パウシモビリス (*Sphingomonas paucimobilis*) は、リポ多糖を全く保有しないこと及びこの菌は菌体脂質としてスフィンゴ糖脂質を含有していることが知られてきた。

**【0003】**

そこで、本願出願人は、上記スフィンゴモナス パウシモビリスの菌体から糖脂質を単離し、さらに、その化学構造を解析し、同定することに成功している（特許文献1）。そして、本願出願人は、上記スフィンゴ糖脂質が優れた保湿効果と肌荒れ防止効果を有しているため化粧品として広く採用しうることを開示している（特許文献2）。加えて、本願出願人は、上記スフィンゴ糖脂質が優れた乳化作用を有することも明らかにしている（特許文献3）。

**【0004】**

加えて、本願出願人は、他のスフィンゴモナス科の菌株から得られたスフィンゴ糖脂質についても化粧組成物及び医薬組成物として優れていることを開示している（特許文献4）。

**【0005】**

一方、T細胞レセプター (TCR) を発現するNKT細胞は、Large Granular Lymphocyte (LGL) 様の形態を示すこと、IL-2R β鎖を常時表出すること、パーフォリンを有する点などでは、NKT細胞と類縁の細胞であるが、TCRを有するという点でNKT細胞とは決定的に異なる細胞群であることが報告されている（非特許文献1）。

かかる状況のもと、非特許文献2及び3には、マウスではIL-12により活性化されたT細胞の中でもNKT1.1を発現しているNKT細胞が、腫瘍の肝臓や肺への血行性転移抑制の重要なエフェクター細胞であることが報告されている（非特許文献2、3）。

以上のように、このNKT細胞は、近年、新しい細胞群として非常に注目を集めている細胞群である。

**【0006】**

さらに特許文献5は、特定の構造を有するα-アグリコシルセラミドがNKT細胞活性剤として有効であると述べている（特許文献5）。しかしながら、より効果的なNKT細胞活性化剤が求められている。

**【0007】**

**【特許文献1】**国際公開92/12986号公報

**【特許文献2】**特開平11-43437号公報

**【特許文献3】**特開2000-51676号公報

**【特許文献4】**特開2002-010797号公報

**【特許文献5】**国際公開98/44928号公報

**【非特許文献1】**J. Immunol., 155, 2972 (1995)

【非特許文献2】J. Immunol., 154, 4333(1995)

【非特許文献3】J. Immunol., 88, 82(1996)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本願発明の目的は、上記課題を解決することであつて、より効果的なNKT細胞活性化用組成物を提供することを目的とする。さらに、IL-4産生促進用組成物及びIFN- $\gamma$ 産生促進用組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

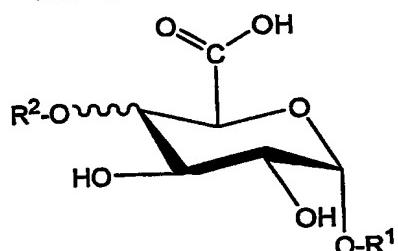
上記課題のもと、本願発明者は下記手段により上記課題を解決しうることを見出した。

【0010】

(1) 下記式(1)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするNKT細胞活性化用組成物。

式(1)

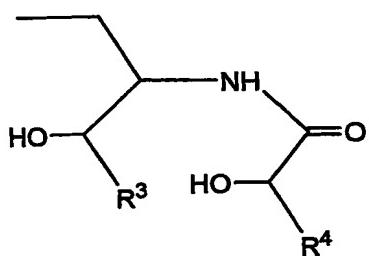
【化1】



(式(1)中、R<sup>1</sup>は、下記式(1-1))

式(1-1)

【化2】



(式(1-1)中、R<sup>3</sup>は、シクロアルキル基を有していてもよいアルキル基又は、アルケニル基であり、R<sup>4</sup>は、アルキル基である。)を表し、

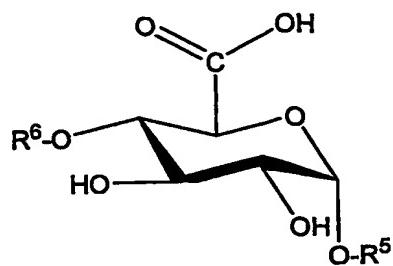
R<sup>2</sup>は、水素原子、或いは、 $\alpha$ -ガラクトース基、 $\alpha$ -グルコース基、 $\alpha$ -マンノース基、 $\alpha$ -グルコサミン基又は $\beta$ -グルコサミン基、又はこれらの組み合わせからなる基である。)

【0011】

(2) 下記式(3)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするNKT細胞活性化用組成物。

式(3)

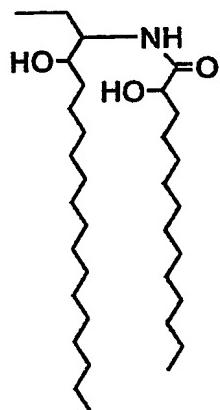
## 【化3】



(式(3)中、R<sup>5</sup>は、下記R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>を表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、R<sup>62</sup>、R<sup>63</sup>、R<sup>64</sup>又はR<sup>65</sup>を表す。)

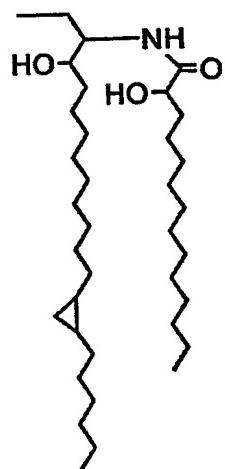
R<sup>51</sup>:

## 【化4】



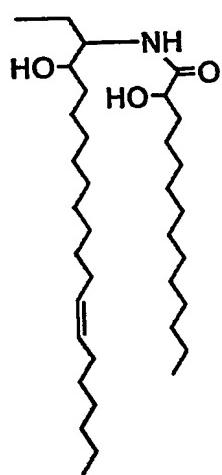
R<sup>52</sup>:

## 【化5】

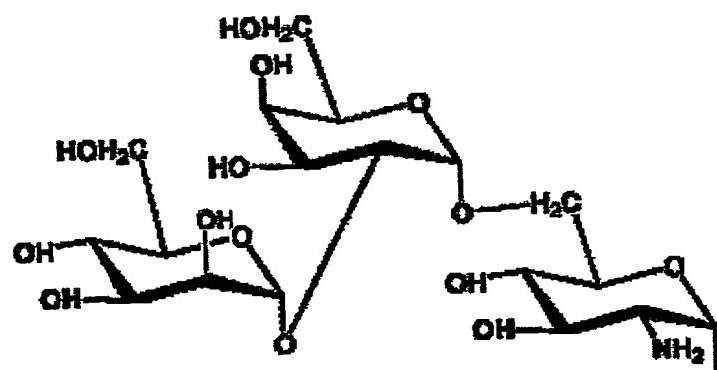


R<sup>53</sup>:

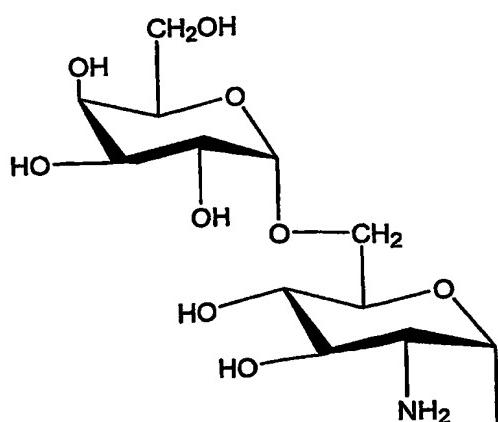
【化6】

R<sup>62</sup> :

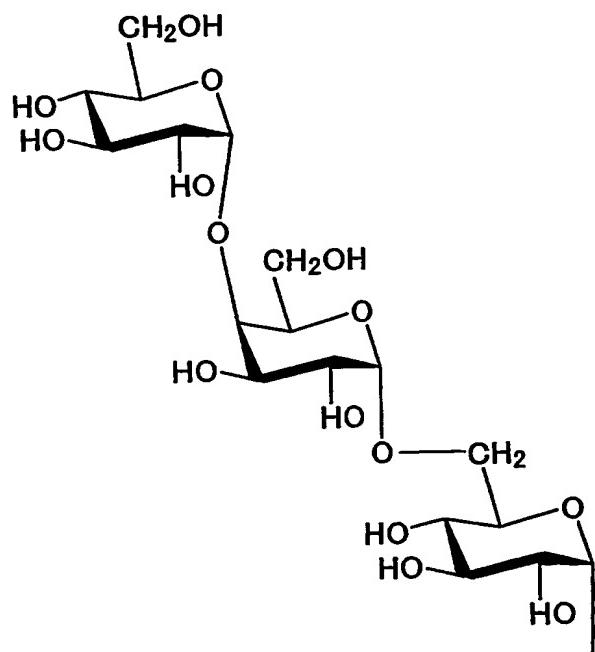
【化7】

R<sup>63</sup> :

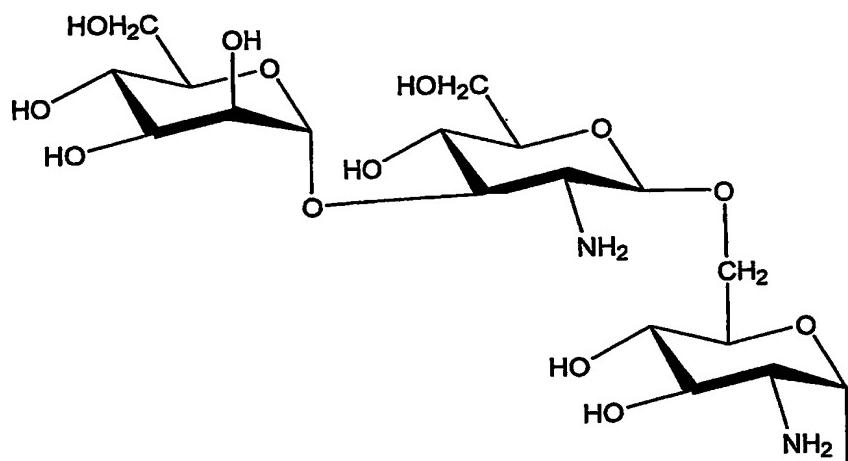
【化8】

R<sup>64</sup> :

## 【化9】

 $R^{65}$ :

## 【化10】

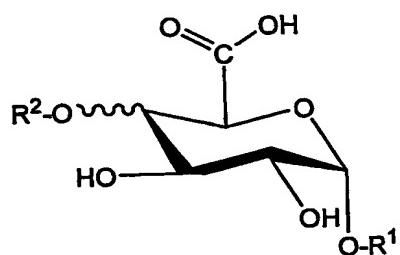


## 【0012】

(3) 下記式(1)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするIL-4産生促進用組成物。

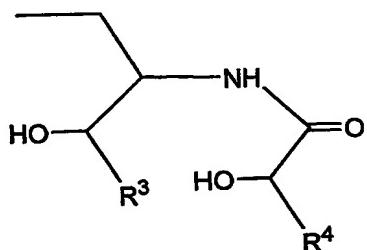
式(1)

## 【化11】



(式(1)中、R<sup>1</sup>は、下記式(1-1)  
式(1-1)

## 【化12】



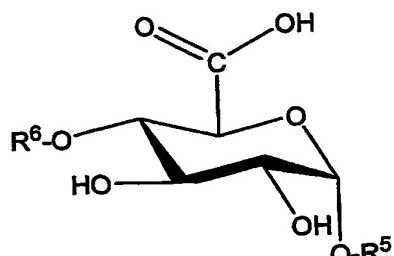
(式(1-1)中、R<sup>3</sup>は、シクロアルキル基を有していてもよいアルキル基又は、アルケニル基であり、R<sup>4</sup>は、アルキル基である。)を表し、R<sup>2</sup>は、水素原子、或いは、 $\alpha$ -ガラクトース基、 $\alpha$ -グルコース基、 $\alpha$ -マンノース基、 $\alpha$ -グルコサミン基又は $\beta$ -グルコサミン基、又はこれらの組み合わせからなる基である。)

## 【0013】

(4) 下記式(3)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするIL-4産生促進用組成物。

式(3)

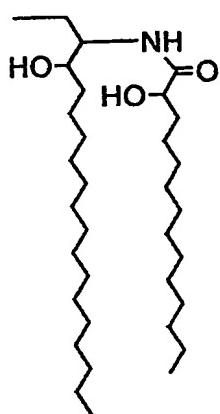
## 【化13】



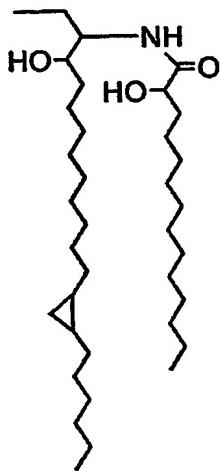
(式(3)中、R<sup>5</sup>は、下記R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>を表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、R<sup>62</sup>、R<sup>63</sup>、R<sup>64</sup>又はR<sup>65</sup>を表す。)

R<sup>51</sup>：

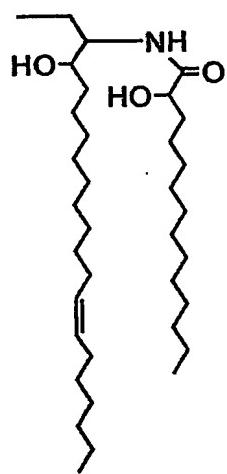
【化14】

R<sup>52</sup> :

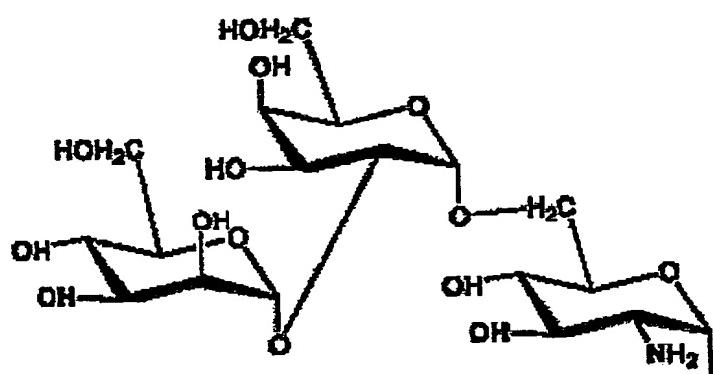
【化15】

R<sup>53</sup> :

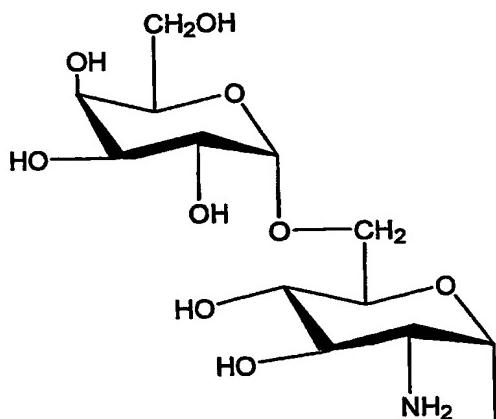
【化16】

R<sup>62</sup> :

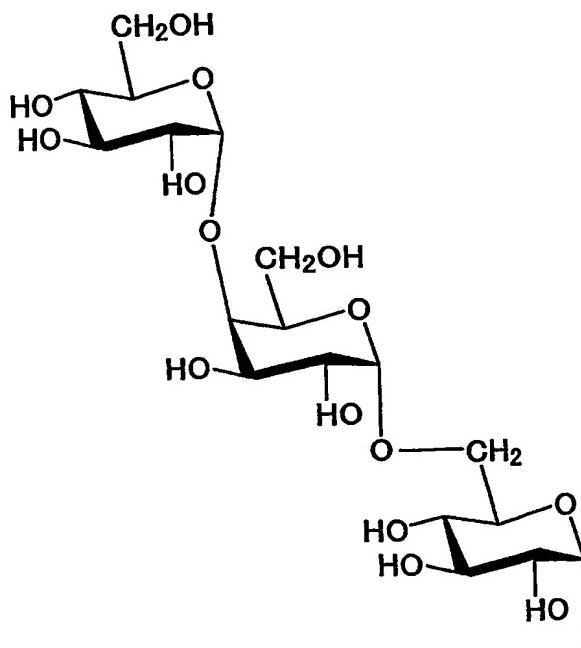
【化17】

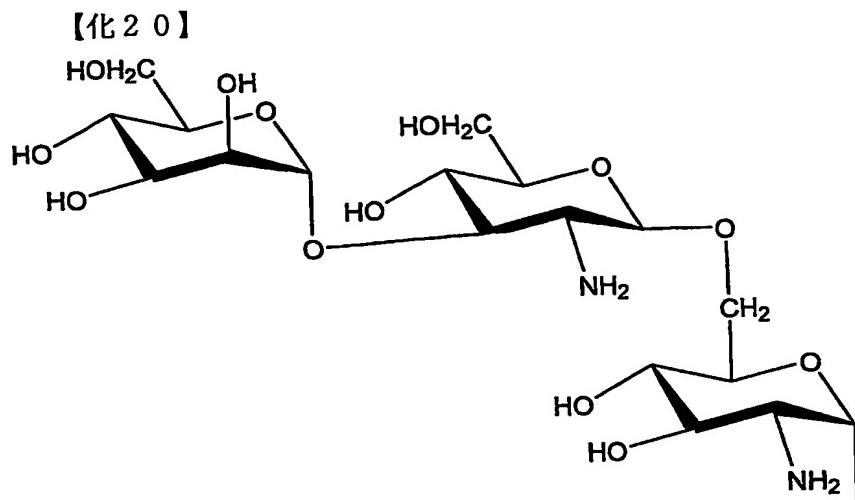
R<sup>63</sup> :

【化18】

R<sup>64</sup> :

【化19】

R<sup>65</sup> :

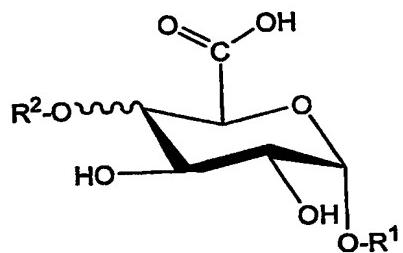


## 【0014】

(5) 下記式(1)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするIFN- $\gamma$ 産生促進用組成物。

式(1)

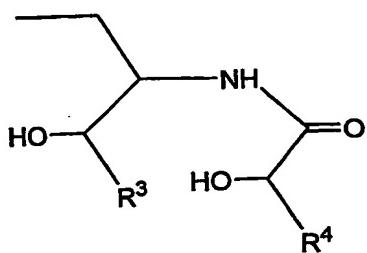
## 【化21】



(式(1)中、R<sup>1</sup>は、下記式(1-1))

式(1-1)

## 【化22】



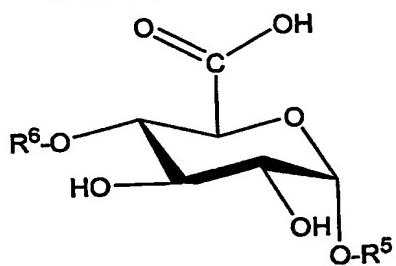
(式(1-1)中、R<sup>3</sup>は、シクロアルキル基を有していてよいアルキル基又は、アルケニル基であり、R<sup>4</sup>は、アルキル基である。)を表し、R<sup>2</sup>は、水素原子、或いは、 $\alpha$ -ガラクトース基、 $\alpha$ -グルコース基、 $\alpha$ -マンノース基、 $\alpha$ -グルコサミン基又は $\beta$ -グルコサミン基、又はこれらの組み合わせからなる基である。)

## 【0015】

(6) 下記式(3)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするIFN- $\gamma$ 産生促進用組成物。

式(3)

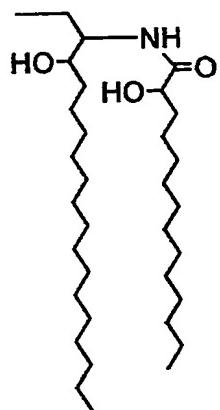
## 【化23】



(式(3)中、R<sup>5</sup>は、下記R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>を表し、R<sup>6</sup>は、水素原子、R<sup>62</sup>、R<sup>63</sup>、R<sup>64</sup>又はR<sup>65</sup>を表す。)

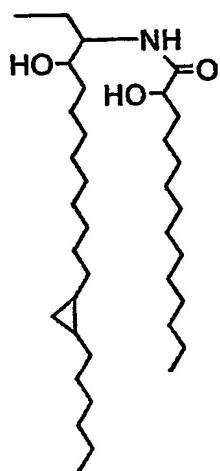
R<sup>51</sup>：

## 【化24】



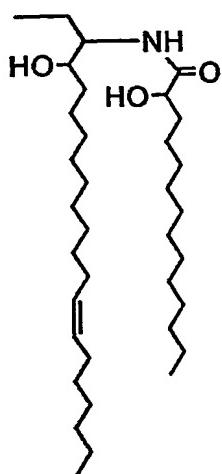
R<sup>52</sup>：

## 【化25】

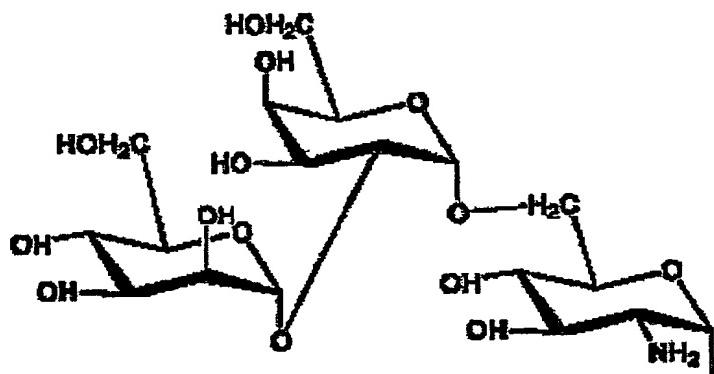


R<sup>53</sup>：

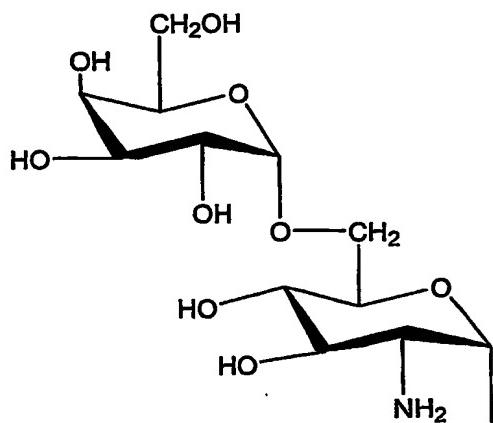
【化26】

R<sup>62</sup> :

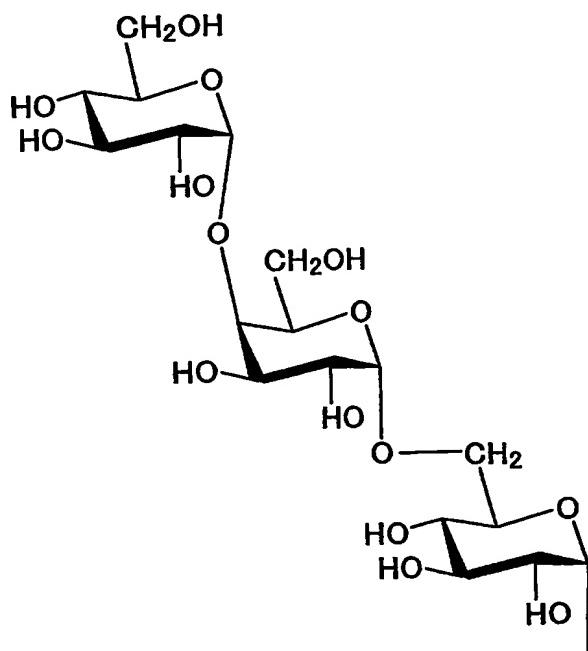
【化27】

R<sup>63</sup> :

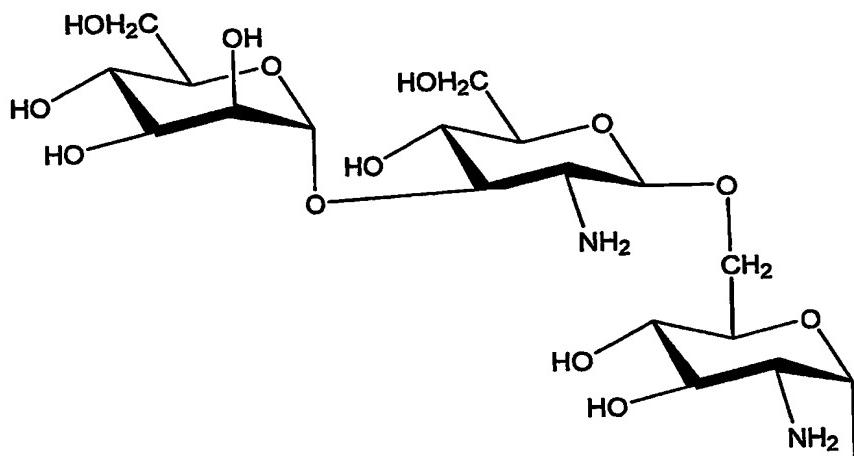
【化28】

R<sup>64</sup> :

## 【化29】

 $R^{65}$ :

## 【化30】



## 【発明の効果】

## 【0016】

本願発明の組成物を採用することにより、より効果的なNKT細胞活性化用組成物が得られた。また、より効果的にIL-4産生及び/又はIFN- $\gamma$ 産生を促進させる組成物が得られた。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0017】

以下において、本願発明の内容について詳細に説明する。尚、本願明細書において「～」とはその前後に記載される数値を下限値及び上限値として含む意味で使用される。

## 【0018】

本願発明で採用するスフィンゴ糖脂質は、上記式(1)で表される構造を有するものである。ここで、式(1)のR<sup>1</sup>に含まれるR<sup>3</sup>のアルキル基が有していてもよいシクロアルキル基は、該アルキル基の末端でもよいし、鎖の中に含まれていてもよい。好ましいシクロアルキル基としては、シクロプロトン基があげられる。R<sup>3</sup>のアルキル基の炭素数として

は、好ましくは13～23、より好ましくは15、16、17、18、19、20又は21である。また、R<sup>3</sup>のアルキル基及びアルケニル基は、好ましくは置換または無置換の直鎖のものである。また、アルケニル基に含まれる2重結合は、いずれの位置にあってもよい。

## 【0019】

一方、R<sup>4</sup>のアルキル基の炭素数は好ましくは10～20、より好ましくは10、11、12、13、14又は15である。さらに、R<sup>4</sup>のアルキル基は、置換または無置換の直鎖アルキル基であることが好ましい。

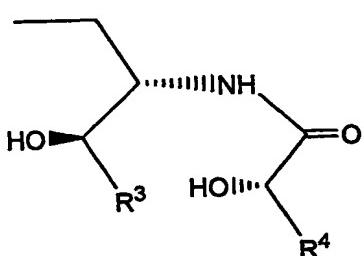
さらに好ましくは、R<sup>1</sup>が上記R<sup>51</sup>～R<sup>53</sup>のいずれかである。

## 【0020】

また、式(1)のR<sup>1</sup>は、下記式(1-2)の立体構造をとるもののが好ましい。

式(1-2)

## 【化31】



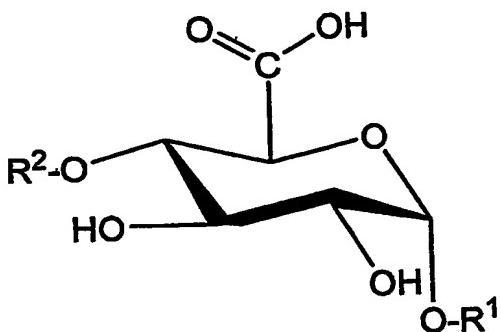
ここで、上記式(1-2)中のR<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>は、上記式(1-1)のR<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>と同義である。従って、上記R<sup>51</sup>～R<sup>53</sup>も上記立体構造をとるもののがより好ましい。

## 【0021】

また、上記式(1)は、好ましくは、下記式(2)、下記式(3)、下記式(4)又は下記式(5)で表されるものである。ここで、式(2)は、

式(2)

## 【化32】



式(2)中、R<sup>1</sup>は及びR<sup>2</sup>は式(1)と同義であり、好ましい範囲も同義である。

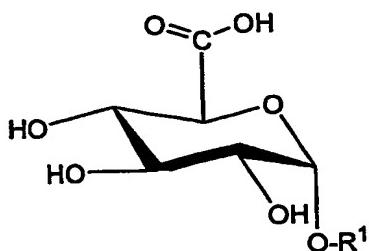
## 【0022】

また、式(3)において、好ましくは、R<sup>5</sup>が、R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>のいずれかであつて、R<sup>6</sup>が水素原子の場合（以下、構造Aということがある）、R<sup>5</sup>が、R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>のいずれかであつて、R<sup>6</sup>がR<sup>62</sup>の場合（以下、構造Bということがある）、R<sup>5</sup>が、R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>のいずれかであつて、R<sup>6</sup>がR<sup>63</sup>の場合（以下、構造Cということがある）、R<sup>5</sup>が、R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>のいずれかであつて、R<sup>6</sup>がR<sup>64</sup>の場合（以下、構造Dということがある）、R<sup>5</sup>が、R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>のいずれかであつて、R<sup>6</sup>がR<sup>65</sup>の場合（以下、構造Eということがある）である。さらにまた、構造Aの中でも、R<sup>5</sup>が、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>のものをより好ましく採用できる。

## 【0023】

式(4)

## 【化33】

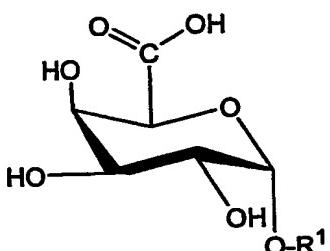


式(4)中、R<sup>1</sup>は、上記式(1)のR<sup>1</sup>と同義である。また、R<sup>1</sup>の好ましい範囲も上記とR<sup>1</sup>と同義である(式(4)で表される化合物の少なくとも一種を含むものを以下、構造AAと呼ぶことがある)。

## 【0024】

## 式(5)

## 【化34】



式(5)中、R<sup>1</sup>は、上記式(1)のR<sup>1</sup>と同義である(以下、構造Fといふことがある)。また、R<sup>1</sup>の好ましい範囲も上記R<sup>1</sup>と同義である。

## 【0025】

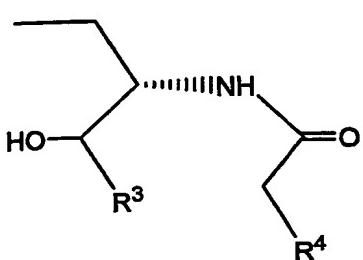
さらに、本願発明のスフィンゴ糖脂質は1種類のみを採用しても良いし、2種類以上を採用しても良い。2種以上を組み合わせて含有させる場合の各成分の比率は特に制限されない。例えば、上記構造Aに該当する3種類の化合物のうち1種類以上を含むもの、上記構造Bに該当する3種類の化合物のうち1種類以上を含むもの、上記構造Fに該当する化合物を少なくとも1種以上含むもの等を挙げることができる。この中でも好ましくは、R<sup>1</sup>が、R<sup>51</sup>、R<sup>52</sup>又はR<sup>53</sup>のいずれかの場合である(以下、構造FAと呼ぶことがある)。

## 【0026】

本願発明で開示する組成物には、上記に加えて、上記式(1)において、式(1)中の式(1-1)が式(1-1-1)の立体構造で表されるものも含まれていてもよい。

## 式(1-1-1)

## 【化35】



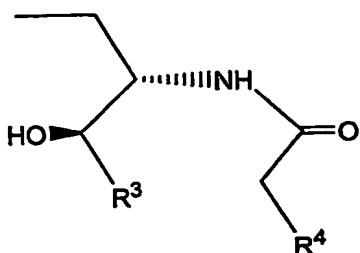
式(1-1-1)中、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、それぞれ、上記式(1)と同義であり、好ましい範囲も同義である。

## 【0027】

式(1-1-1)は、さらに好ましくは、下記式(1-1-2)で表される立体構造のものである。

式(1-1-2)

【化36】



式(1-1-2)中、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、それぞれ、上記式(1)と同義であり、好ましい範囲も同義である。

【0028】

式(1)で表されるスフィンゴ糖脂質は、スフィンゴ糖脂質を有する菌体から抽出することによって得ることができる。例えば、国際公開92/12986号公報や特開2002-10797号公報に記載の方法を採用することができる。スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴモナス科に属する菌体中に含まれていることから、スフィンゴモナス科に属する菌のいずれかを用いて抽出すれば式(1)で表されるスフィンゴ糖脂質を得ることができる。ここで、スフィンゴモナス科に属する菌とは、従来から一般的に「スフィンゴモナス属」に属する菌と言わわれているものの他、該菌と実質的に同じ科に属するものとして分類される菌を含む趣旨である。本願発明で採用できる菌株としては、例えば、Microbiol. Immunol., 2000, 44, 563-575に示されるいずれの菌株も採用することができる。

式(1)で表されるスフィンゴ糖脂質は、アセトンに対して不溶性であることから、抽出操作を行なう前に菌体をアセトンで洗浄しておくのが好ましい。式(1)のスフィンゴ糖脂質の抽出に用いる溶媒は、メタノールなどのアルコール系溶媒またはアルコール系溶媒とクロロホルムなどの極性溶媒の混合溶媒にするのが収率の点で好ましい。ただし、スフィンゴ糖脂質溶解性の溶媒であれば、これらの以外の溶媒を用いても構わない。

【0029】

スフィンゴ糖脂質の混合物が得られた場合は、本技術分野で周知の方法にしたがって各成分を分離することができる。たとえば、クロマトグラフィー法によって、スフィンゴ糖脂質は完全に分離することができる。溶出液としてクロロホルム／メタノール混合溶液を用いた場合は、構造A、構造F、構造C、構造Bあるいは構造Dあるいは構造Eの順に各スフィンゴ糖脂質が溶出し、構造B、D、Eは、一般的に異なる菌株が产生するため、極めて簡便に分離することができる。充填剤、溶出液、溶出速度、圧力、温度などのクロマトグラフィーの分離条件については、適宜調節することができる。また、スフィンゴ糖脂質の混合物に含まれる特定の物質のみに選択的に反応する試薬を作用させて該物質の誘導体を調製し、その誘導体の化学的性質または物理的性質を利用して分離を行なうこともできる。菌として、スフィンゴモナスパウシモビリス (*Sphingomonas paucimobilis*) を用いた場合には、一般に構造Aのスフィンゴ糖脂質と構造Bのスフィンゴ糖脂質が得られる。また、スフィンゴモナスカプスラータ (*Sphingomonas capsulata*) (新名：*Novosphingobium capsulatum*) を用いた場合には、一般に構造Aのスフィンゴ糖脂質と構造Cのスフィンゴ糖脂質が得られる。さらに、スフィンゴモナスアドハエシバ (*Sphingomonas adhaesiva*) を用いた場合には、一般に構造Aのスフィンゴ糖脂質と構造Dのスフィンゴ糖脂質が得られる。加えて、スフィンゴモナススピーシーズMK346 (*Sphingomonas* sp. MK346) を用いた場合には、一般に構造Aのスフィンゴ糖脂質と構造Eのスフィンゴ糖脂質が得られる。また、スフィンゴモナスウィッティチアイ (*Sphingomonas wittichii*)、スフィンゴモナスマクロゴルタビダス (*Sphingomonas macrogoltabidus*) (新名：*Sphingopyxis macrogoltabida*)、フィンゴモナステラエ (*Sphingomonas terrae*) 又はスフィンゴモナスヤノイクヤエ (*Sphingomonas yanoikuyae*) (新名：*Sphingobium yanoikuyae*) を用いた場合には、一般に構造AA (例えば、構造A) のスフィンゴ糖脂質と構造F (例えば、構造FA

) のスフィンゴ糖脂質が得られる。したがって、これらの情報に基づいて菌を選択すれば、目的とするスフィンゴ糖脂質を効率よく得ることができる。

#### 【0030】

式(1)で表されるスフィンゴ糖脂質は、周知の合成法を組み合わせることによって合成することもできる。たとえば、糖とスフィンゴシン部分をあらかじめ合成するか、菌体から抽出しておき、アミド結合を形成することによって式(1)で表される各スフィンゴ糖脂質を調製することができる。

#### 【0031】

本願発明のNKT細胞とは、例えば、ヒトV $\alpha$ 24+NKT細胞及びマウスV $\alpha$ 14+NKT細胞を含む趣旨である。また、NKT細胞活性化とは細胞傷害活性の増強、サイトカイン産生増強及びNKT細胞の増殖促進を含む意図である。さらに、本願発明のNKT細胞活性化組成物は、結果として、IL-4の産生及びIFN- $\gamma$ の産生を促進する。従つて、IL-4又はIFN- $\gamma$ によって促進される各種機能の促進用組成物としても使用することができる。IL-4によって促進されるものの例としては、Th2の誘導、抗体のことができる。IL-4によって促進されるものの例としては、Th2の誘導、マクロファージ活性化作用が挙げられる。

ここで、サイトカインの増強として、上記のほか、各種IL、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、腫瘍壞死因子(TNF)、リンホトキシン、造血因子のコロニー刺激因子(CSF)、エリスロポエチン、造血因子の上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)等の活性化促進作用組成物としても利用することができる。さらに、本願発明で開示した上記スフィンゴ糖脂質は、上記以外の免疫活性化組成物や、がん細胞のアポトーシス誘導化組成物、NF-kappaB活性化促進、I kappaBの分解、p38のリン酸化、Aktのリン酸化等を目的とした、産生又は活性化促進用組成物としても利用できる。

#### 【0032】

また、本願発明の組成物を医薬品若しくは医薬部外品としてのNKT細胞活性化剤やその有効成分として利用する場合、好ましくは、当業者に周知の方法によって製造可能な医薬組成物として投与することができる。医薬用組成物としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、液剤、及びシロップ剤等をあげることができる。上記の医薬組成物は、薬理学的、製剤学的に許容し得る添加物を加えて製造することができる。薬理学的、製剤学的に許容し得る添加物の例としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし崩壊補助剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等をあげることができる。上記の医薬組成物には、本願発明の趣旨を逸脱しない範囲内で、他のNKT細胞活性化剤を1種又は2種以上配合してもよい。本願発明の医薬の投与量は特に限定されず、有効成分の種類などに応じて適宜選択することができ、さらに患者の体重や年齢、疾患の種類や症状、投与経路など通常考慮すべき種々の要因に応じて、適宜増減することができる。一般的には、成人一日あたり、0.001~100mg好ましくは0.01~10mgの範囲で用いることができる。また、投与方法も特に限定されず、注射剤、輸液剤等として、静脈注射により投与してもよいし、経口的に投与してもよい。

#### 【実施例】

#### 【0033】

以下に実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明する。以下の実施例に示す材料、使用量、割合、処理内容、処理手順等は、本願発明の趣旨を逸脱しない限り、適宜、変更することができる。従って、本願発明の範囲は以下に示す具体例に限定されるものではない。

#### 【0034】

#### NKT細胞活性化の測定

スフィンゴ糖脂質：スフィンゴモナスパウシモビリスから產生された構造Aのもの(GSL-1)、スフィンゴモナスパウシモビリスから產生された構造Bのもの(GSL-2)

)、スフィンゴモナスヤノイクヤエから產生された構造AAのもの(GSL-6)、スフィンゴモナスヤノイクヤエから產生された構造Fのもの(GSL-7)を採用した。

### 【0035】

動物：

試験用マウスとして、C57BL/10ScSnマウス(以下、正常マウスという。)及びC57BL/10ScCrマウス(TLR4欠損IL-12R $\beta$ 2鎖変異マウス)(以下、TLR4欠損マウスという。)(マックスプランク免疫生物学研究所、ドイツ、フライブルグ市)(7週齢、雌)を使用した。GSL-1およびGSL-2はTLRを介して正常マウスのマクロファージを活性化し、IL-12産生を誘導する。TLR4欠損マウスは、IL-12受容体の $\beta$ 鎖に変異があり、IL-12が作用しないものである。IL-12は免疫系を強力に活性化する物質であるが、本実施例のTLR4欠損マウスを用いると本願発明で採用するスフィンゴ糖脂質のNKT細胞に対する活性化促進をIL-12の作用を受けない状態で、より明確にすることができる。

### 【0036】

サンプルの作成：

上記スフィンゴ糖脂質のいずれか10 $\mu$ gを、正常マウス及びTLR4欠損マウスに投与した。投与は、尾静脈内投与により行った。そして、対照として生理食塩水を投与したもの(Control)、投与後1日経過時(Day 1)及び2日経過時(Day 2)の血清及び肝臓を採取した。

### 【0037】

肝臓内白血球の分離：

採取した肝臓を2枚のスライドガラスを用いてつぶした。細胞浮遊液を500rpm、1分間遠心した。得られた上清を1200rpm(300g)、5分遠心した。その沈渣を30%のパーコール(ファルマシア社製)に懸濁し、さらに、これを、67.5%パーコールの上に重層して、20℃、2000rpm(800g)、30分遠心し、30%と67.5%パーコールの境界に白血球を集積させ回収した。得られた細胞をハンクス液で3回洗浄して肝臓内白血球を得た。

### 【0038】

フローサイトメトリー：

FcRを介した蛍光標識抗体の非特異的結合を防ぐため、抗Fc $\gamma$ R(2.4G2)を用いた。抗体は、PE標識抗NK1.1抗体(日本ベクトン・ディッキソン(株)製、K136)及びビオチン標識抗TCR $\alpha\beta$ 抗体(日本ベクトン・ディッキソン(株)製、H57-597)を用いた。細胞に各抗体を添加した後、4℃、暗所で30分反応させた。尚、ビオチン標識抗体を用いた細胞は、Cy-chrome結合ストレプトアビジン(日本ベクトン・ディッキソン株式会社製、554062)を4℃、暗所で30分反応させた。上記抗体、Cy-chrome結合ストレプトアビジンの染色及び細胞の洗浄には0.1%NaN<sub>3</sub>含有1%血清アルブミンを用いた。細胞は染色後、1%パラホルムアルデヒド含有PBS(-)で固定した。測定はHYPERLINK "http://cent-scorpio.asahikawa-med.ac.jp/central/image/biochemistry/fcm.html" 自動細胞解析分離装置(ベックマンコルター(株)、COULTER EPICS ELITE ESP)で行った。また、PE標識抗NK1.1抗体を用いた場合で、順に、GSL-1、2、6、7を投与した場合を、図5及び図6は、それぞれ、TLR4欠損マウスを用いた場合で、順に、GSL-1、2を投与した場合を示している。

### 【0039】

上記PE標識抗NK1.1抗体(又はCD11a)を用いた方法によって得られたフローサイトメトリーの結果を図1～図6に示す。ここで、図1～図4は、それぞれ、正常マウスを用いた場合で、順に、GSL-1、2、6、7を投与した場合を、図5及び図6は、それぞれ、TLR4欠損マウスを用いた場合で、順に、GSL-1、2を投与した場合を示している。

ここで、図中に示した数字は、NK1.1(又はCD11a)とTCR $\alpha\beta$ の両方を発現した細胞の割合(%)を示している。尚、NK1.1(又はCD11a)とTCR $\alpha\beta$

の両方を発現したものは、NKT細胞である。

#### 【0040】

また、日を変えて、上記と同様に、PE標識抗NK1.1抗体を用いた方法によって得られた正常マウスのフローサイトメトリーの結果（NKT細胞の割合）を図7に示す。ここで、図中に示した数字は両方を発現した細胞の割合（%）を示し、図中の米印は、t検定により統計的にコントロール（control）と有意な差が認められたものである。

#### 【0041】

IFN- $\gamma$ の存在の確認：

GSL-1又はGSL-2を添加した場合の血中のIFN- $\gamma$ 量が増加するかについて検討した。上記正常マウス及びTLR4欠損マウスに、GSL-1又はGSL-2を上記と同様の方法により投与し、血清中に含まれるIFN- $\gamma$ を解析した。

IFN- $\gamma$ は、捕捉抗体として精製抗IFN- $\gamma$ 抗体（R4-6A2）と、検出抗体としてビオチン結合抗IFN- $\gamma$ 抗体（AN-18）を用いたサンドイッチELISA法を行った。ビオチン結合抗体に続く反応でアルカリ性フォスファターゼ標識ストレプトアビジン（ZYME D、43-4822）を結合させ、 $\rho$ -ニトロフェニルリン酸塩（SIGMA、N-4645）を基質として発色させた。マイクロプレートリーダー（日本バイオラドラボラトリーズ株式会社、Model 1550）で405nmと対照として540nmの波長の吸光度を観察した。この結果、正常マウスにおいて、図8に示すように、IFN- $\gamma$ の産生が促進されていることが認められた。尚、TLR4欠損マウスの場合、IL-12に反応しないため、GSL-1又はGSL-2を投与してもIFN- $\gamma$ は検出されなかった。

#### 【0042】

IFN- $\gamma$ 産生NKT細胞のフローサイトメトリー：

GSL-1又はGSL-2を投与した場合の正常マウスについて、上記と同様の方法でフローサイトメトリーを行い、（PE標識抗NK1.1抗体、ビオチン標識抗TCR $\alpha\beta$ 抗体、FITC標識抗IFN- $\gamma$ 抗体（日本ベクトンディッキンソン株式会社製、品番554410）にて染色して、IFN- $\gamma$ 産生NKT細胞の割合を測定した。その結果を図9に示す。ここで、図中の数字は、NK1.1とTCR $\alpha\beta$ の両方を発現した、IFN- $\gamma$ 産生NKT細胞の割合に相当する。

#### 【0043】

IL-4の測定：

GSL-1又はGSL-2を添加した場合の血中のIL-4量が増加するかについて検討した。上記正常マウス及びTLR4欠損マウスに、GSL-1又はGSL-2を上記と同様の方法により投与し、血清中に含まれるIL-4を解析した。

IL-4の測定は、マウスIL-4 BD Opti EIA ELISA Set（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製、555232）を用いて該マニュアルに従って測定した。結果、いずれのマウスについても、IL-4の増加が認められた。特に、図10に示すとおり、TLR4欠損マウスにおいて、IL-4の顕著な産生促進が認められた。

#### 【0044】

本願発明のスフィンゴ糖脂質を添加した場合、上記フローサイトメトリーにおいて、NK1.1とTCR $\alpha\beta$ の両方に発現したものとの割合の増加が認められたこと、及び、これらの増加が大きいものについては、IFN- $\gamma$ とIL-4の両方が産生されていることが確認できたことから、本願発明のスフィンゴ糖脂質がNKT細胞の活性化に有効であることが認められた。

【図面の簡単な説明】

#### 【0045】

【図1】正常マウスにGSL-1を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図2】正常マウスにGSL-2を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析

結果を示す。

【図3】正常マウスにGSL-6を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図4】正常マウスにGSL-7を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図5】TLR4欠損マウスにGSL-1を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図6】TLR4欠損マウスにGSL-2を投与した場合のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図7】正常マウスに各種GSL-1～4を投与した場合のNTK細胞の変化を示す。

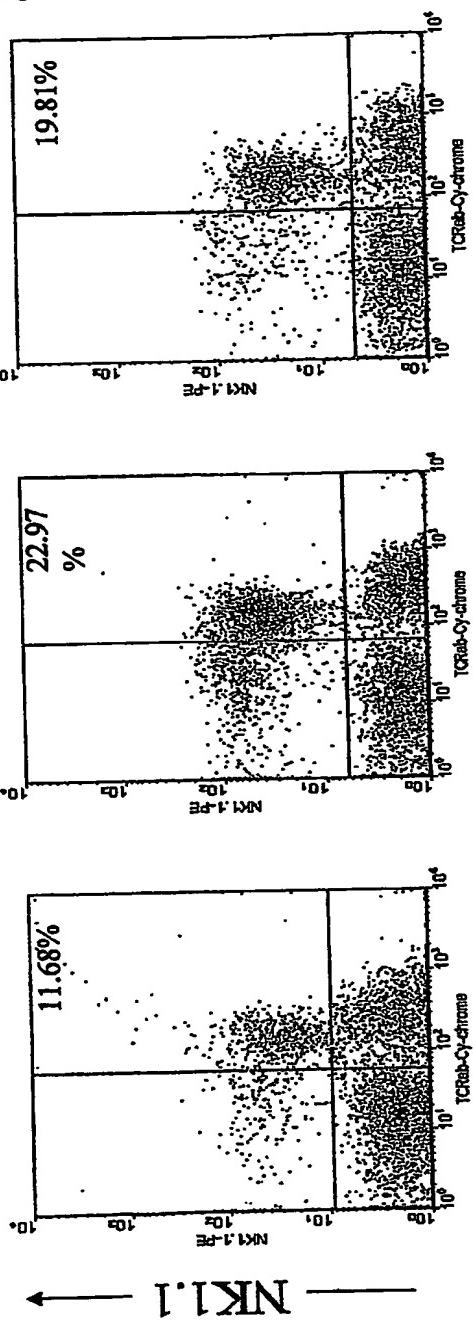
【図8】正常マウスにおけるGSL-1又はGSL-2投与後のIFN- $\gamma$ の濃度を示す。

【図9】正常マウスにおけるGSL-1又はGSL-2を投与した場合のINF- $\gamma$ 産生NTK細胞の変化を示す。

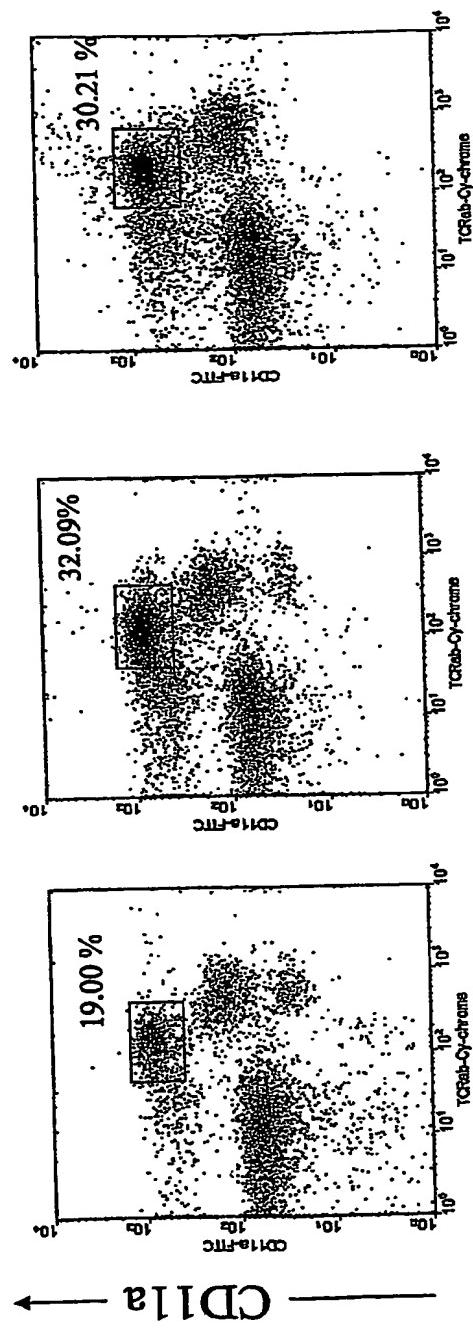
【図10】TLR4欠損マウスにおけるGSL-1又はGSL-2投与後のIL-4の濃度を示す。

【書類名】 図面  
【図1】

Control Day 1 Day 2



← NKG1-1

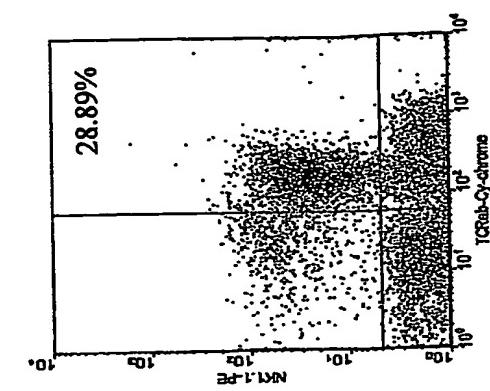


← CD11a

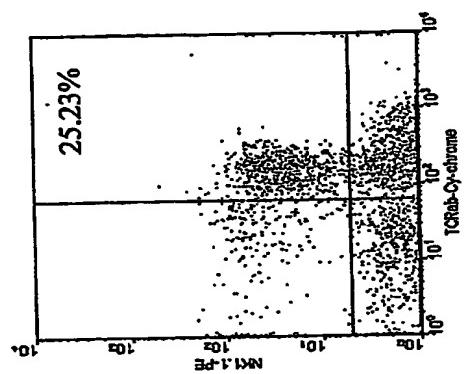
TCR $\alpha\beta$

【図 2】

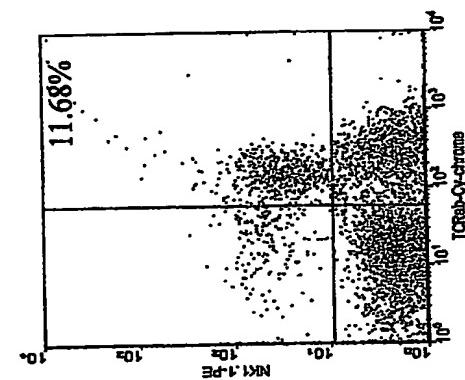
Day 2



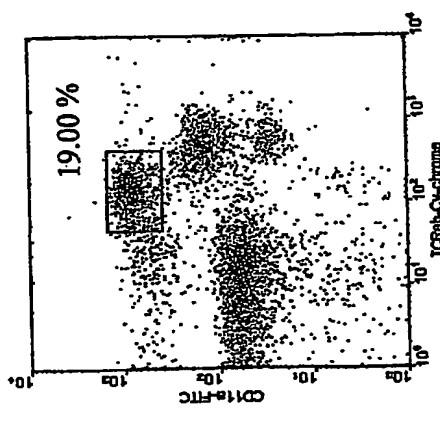
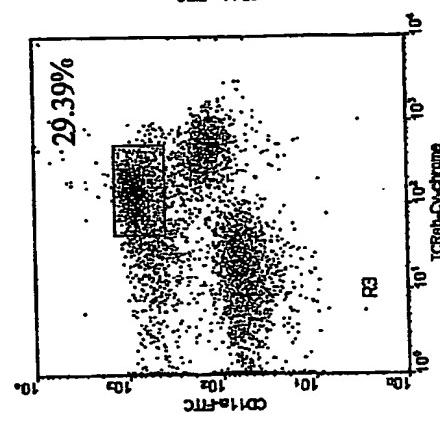
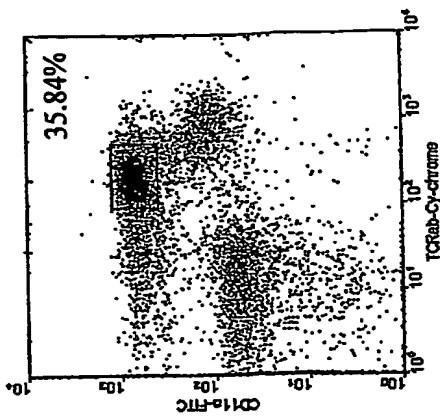
Day 1



Control



NKG1

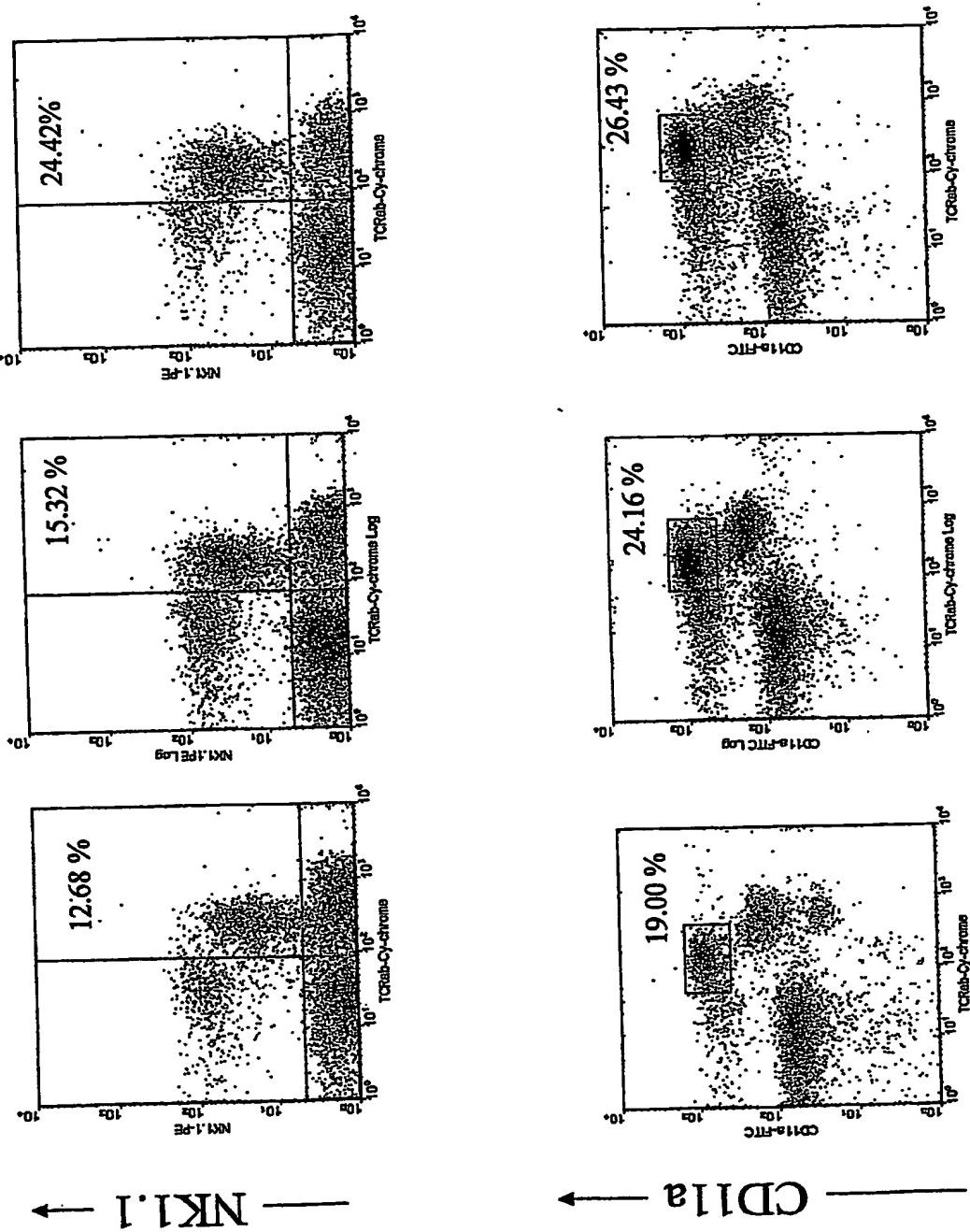


CD11a

TCR $\alpha\beta$

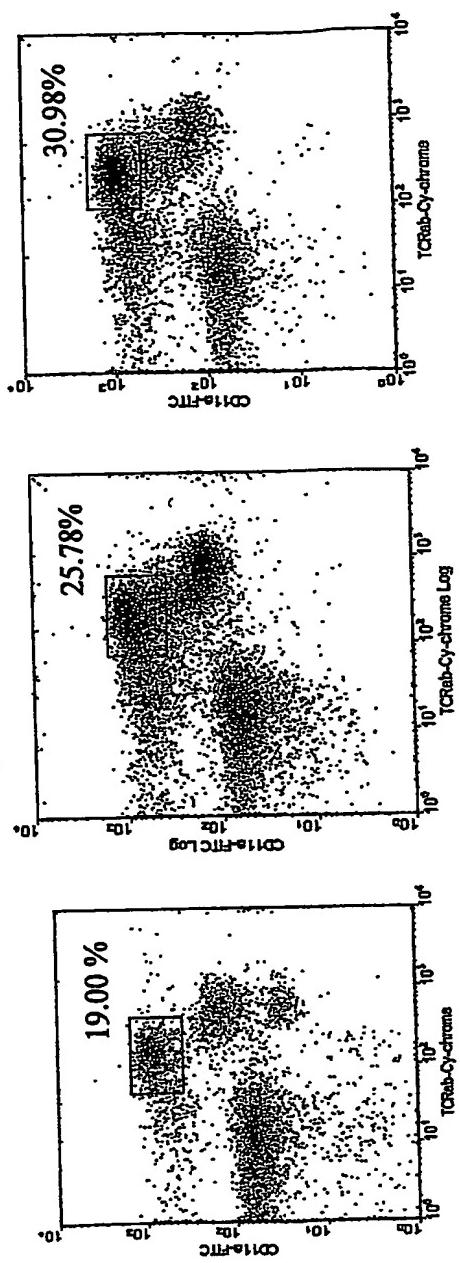
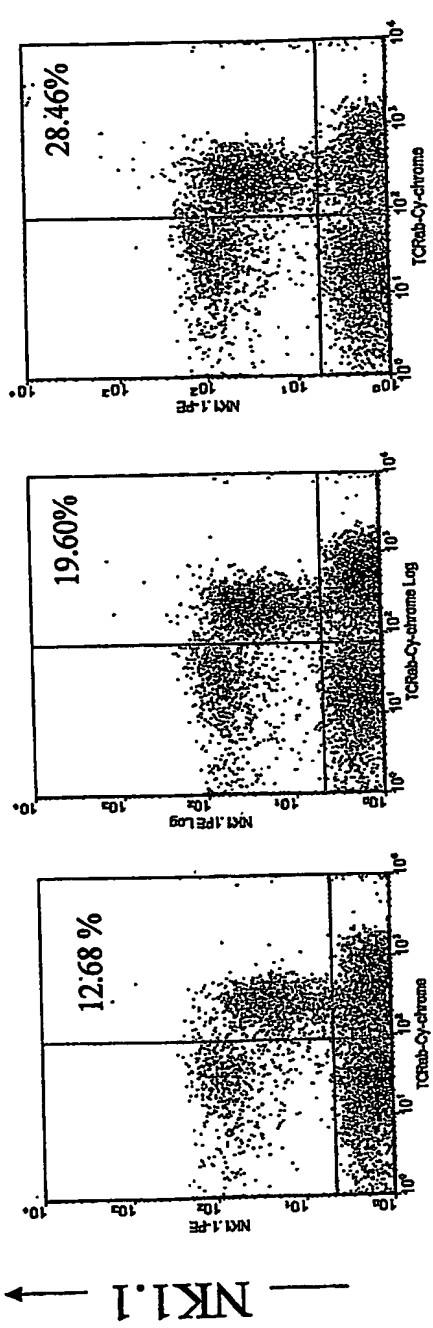
【図3】

Control      Day 1      Day 2



【図4】

Control      Day 1      Day 2

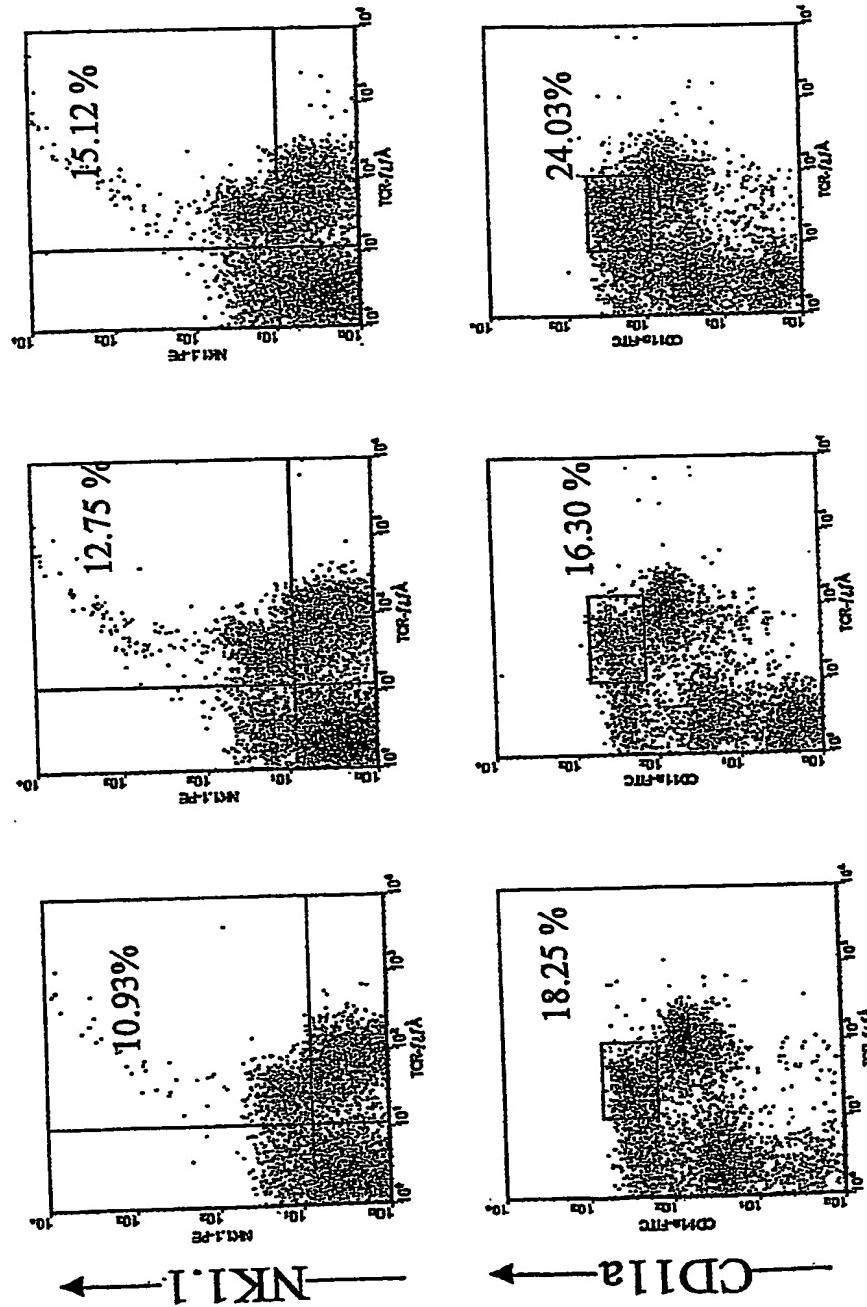


TCR $\alpha\beta$

CD11a

【図5】

Day 2

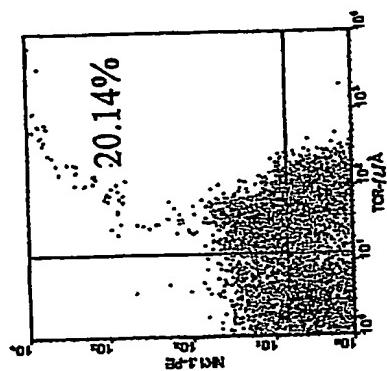


Day 1

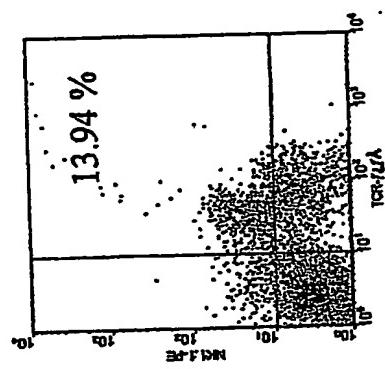
Control

【図6】

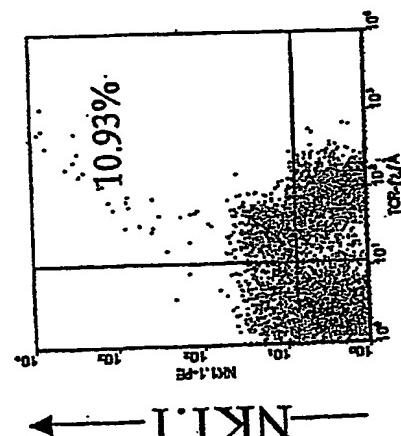
Day 2



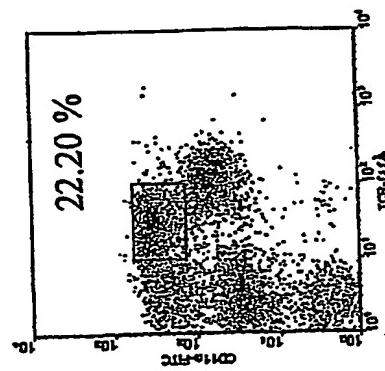
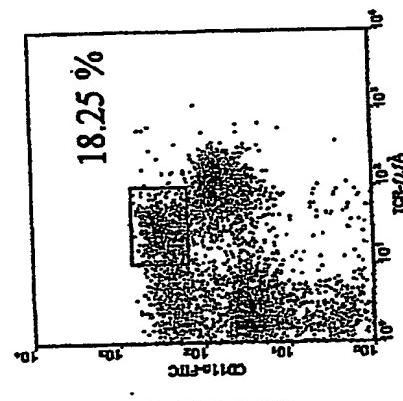
Day 1



Control



← NK1.1 ←

TCR $\alpha\beta$ 

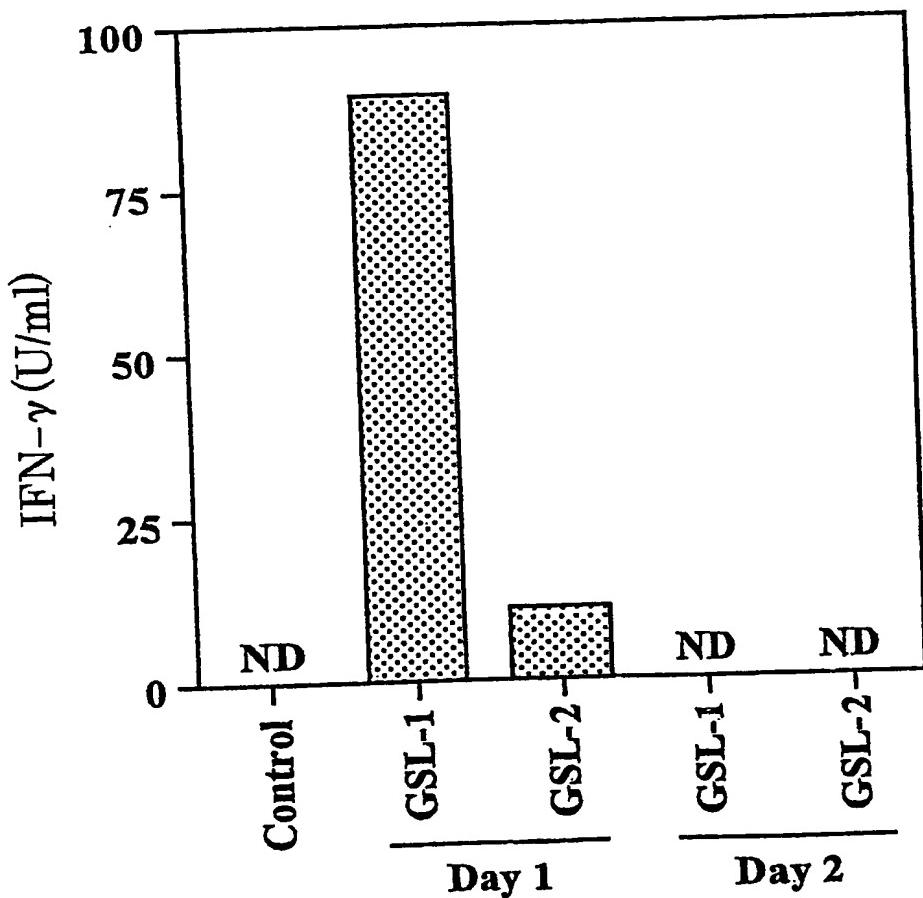
← CD11a ←

【図7】

	Day1	Day2
Control	14.5	13.7
GSL-1	18.4	22.8 *
GSL-2	21.7 *	26.1 *
GSL-6	14.6	23.4 *
GSL-7	11.9	23.2 *

単位は(%)である。

【図8】

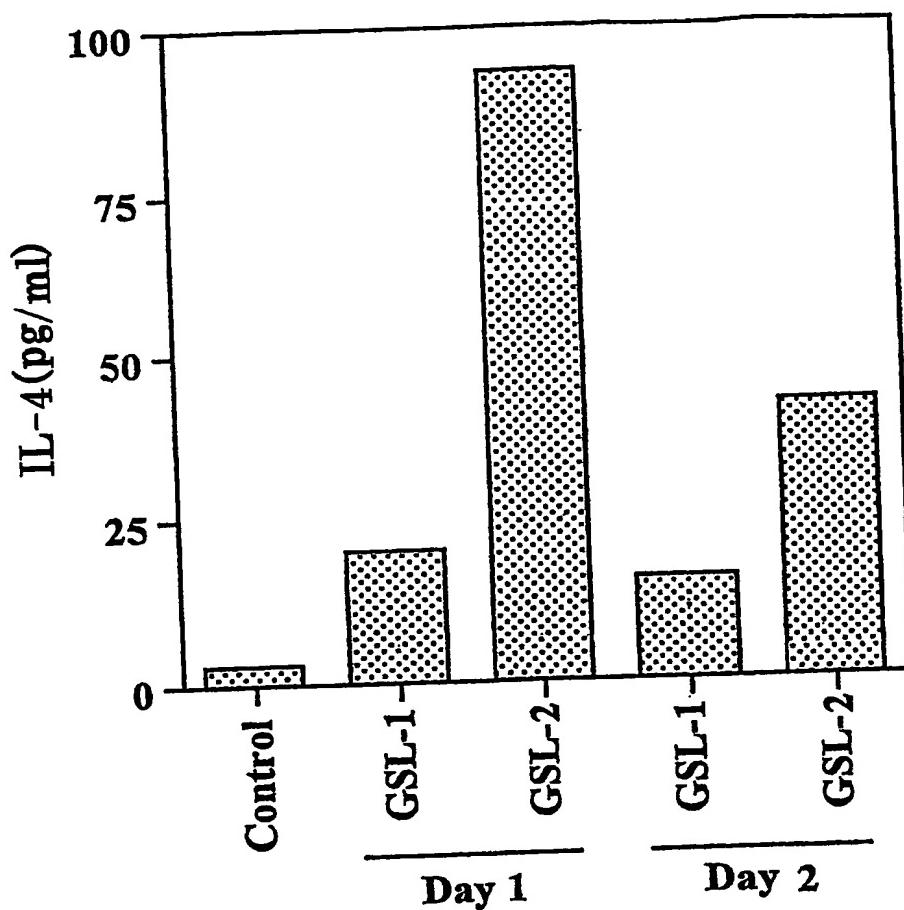


【図9】

	Day1	Day2
Control	3.4	3.4
GSL-1	9.8	35.5
GSL-2	24.0	25.9

単位は(%)である。

【図10】



【書類名】要約書

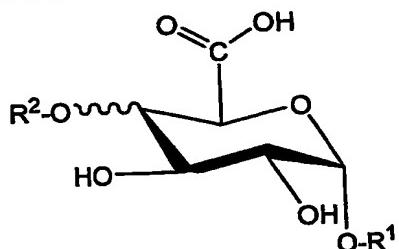
【要約】

【課題】 より効果的なNKT細胞活性化用組成物を提供する。

【解決手段】 下記式(1)で表される構造を有するスフィンゴ糖脂質を含有することを特徴とするNKT細胞活性化用組成物。

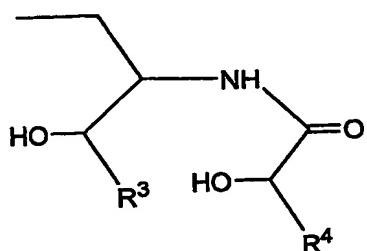
式(1)

【化1】

(式(1)中、R<sup>1</sup>は、下記式(1-1))

式(1-1)

【化2】



(式(1-1)中、R<sup>3</sup>は、シクロアルキル基を有していてもよいアルキル基又は、アルケニル基であり、R<sup>4</sup>は、アルキル基である。)を表し、  
R<sup>2</sup>は、水素原子、或いは、 $\alpha$ -ガラクトース基、 $\alpha$ -グルコース基、 $\alpha$ -マンノース基、 $\alpha$ -グルコサミン基又は $\beta$ -グルコサミン基、又はこれらの組み合わせからなる基である。)

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 A41108J  
【提出日】 平成16年 3月19日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
  【出願番号】 特願2004- 43481  
【承継人】  
  【持分】 70/100  
  【識別番号】 000141510  
  【氏名又は名称】 株式会社紀文フードケミファ  
【承継人】  
  【持分】 30/100  
  【識別番号】 504064836  
  【氏名又は名称】 熊沢 義雄  
【承継人代理人】  
  【識別番号】 110000109  
  【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
  【代表者】 今村 正純  
【手数料の表示】  
  【予納台帳番号】 170347  
  【納付金額】 4,200円  
【その他】 本手続は、出願時の特許出願人等の持分を定めたものである。

## 認定・付加情報

特許出願の番号 特願2004-043481  
受付番号 50400458380  
書類名 出願人名義変更届  
担当官 小松 清 1905  
作成日 平成16年 7月26日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【承継人】

【識別番号】 000141510  
【住所又は居所】 東京都中央区入船2丁目1番1号  
【氏名又は名称】 株式会社紀文フードケミファ

## 【承継人】

【識別番号】 504064836  
【住所又は居所】 神奈川県川崎市中原区井田2-25-1  
【氏名又は名称】 熊沢 義雄

## 【承継人代理人】

【識別番号】 110000109  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル  
8階  
【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

特願 2004-043481

出願人履歴情報

識別番号

[000141510]

1. 変更年月日 2003年 9月29日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区入船2丁目1番1号  
氏 名 株式会社紀文フードケミファ

特願 2004-043481

## 出願人履歴情報

識別番号 [504064836]

1. 変更年月日 2004年 2月19日

[変更理由] 新規登録

住所 神奈川県川崎市中原区井田2-25-1  
氏名 熊沢 義雄

2. 変更年月日 2005年 2月18日

[変更理由] 住所変更

住所 神奈川県川崎市中原区井田2-25-4  
氏名 熊沢 義雄

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP05/003234

International filing date: 21 February 2005 (21.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-043481  
Filing date: 19 February 2004 (19.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**  
**As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox**